






B1

**Agents for treating human diseases, particularly cancer, modulate interaction of beta-catenin with transcription factors or tumor suppressor gene products****Publication number:** DE19909251**Publication date:** 1999-08-26**Inventor:** BIRCHMEIER WALTER (DE); KRIES JENS-PETER VON (DE)**Applicant:** MAX DELBRUECK CENTRUM (DE)**Classification:**

**- international:** G01N33/53; A61K38/00; A61K45/00; A61P17/14; A61P35/00; A61P43/00; C07K14/47; C07K19/00; G01N33/543; A61K38/00; G01N33/53; A61K38/00; A61K45/00; A61P17/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K14/435; C07K19/00; G01N33/543; A61K38/00; (IPC1-7): A61K38/17; C07K14/435

**- European:** C07K14/47A1

**Application number:** DE19991009251 19990222**Priority number(s):** DE19991009251 19990222; DE19981007390 19980221**Also published as:**

 WO9942481 (A3)  
 WO9942481 (A2)  
 EP1054899 (A3)  
 EP1054899 (A2)  
 US7067474 (B1)

more &gt;&gt;

**Report a data error here****Abstract of DE19909251**

Agent (A) for treating human disease is based on substances (I) that modulate (inhibit or promote) the interaction of beta -catenin (bC) with transcription factors or products of tumor suppressor genes. Independent claims are also included for the following: (a) peptide (II) comprising part of the LEF-1/TCF-4 transcription factors, or their variants and mutants; (b) peptide and related molecules (III) from the armadillo domain (arm units 3-8) of bC, and mutants of the complete bC molecule, that include at least one of the specific interaction domains for LEF-1, TCF-4, APC, conductin or E-cadherin; and (c) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening substance libraries for compounds that modulate interaction of bC with LEF-1/TCF, APC, conductin or E-cadherin.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 199 09 251 A 1**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 38/17**  
C 07 K 14/435

21 Aktenzeichen: 199 09 251.6  
22 Anmeldetag: 22. 2. 99  
43 Offenlegungstag: 26. 8. 99

DE 199 09 251 A 1

66 Innere Priorität:  
198 07 390. 9 21. 02. 98

71 Anmelder:  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

72 Erfinder:  
Birchmeier, Walter, Prof., 16341 Schwanebeck, DE;  
Kries, Jens-Peter von, Dr., 16341 Zepernick, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

54 Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen, ausgehend von  $\beta$ -Catenin, seine Herstellung und seine Verwendung

57  $\beta$ -Catenin ist ein zentrales Molekül des Wnt-Signalweges. Erhöhung von  $\beta$ -Catenin in der Zelle führt zur Translokation in den Zellkern und zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie. Dies kann zu Kolonkarzinomen und Melanomen führen (onkogener Signalweg).  $\beta$ -Catenin interagiert aber auch mit den Tumorsuppressorgenen APC, Conductin und E-cadherin, die eine gegenteilige Wirkung auf die Zelle ausüben (anti-onkogene Wirkung).

Die Erfindung betrifft von LEF-1/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und analoge Moleküle in der Tumorthherapie, insbesondere zur Behandlung von Kolonkarzinomen und Melanomen. Diese Peptide und analogen Moleküle beeinflussen die Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und LEF-1/TCF. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

Wesentlicher Teil der Erfindung sind Peptide, die Teile der LEF-1/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten. Sie bestehen vorzugsweise aus 10-40 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4. Im weiteren umfaßt die Erfindung Peptide oder analoge Moleküle, abgeleitet aus der Armadillo-Region von  $\beta$ -Catenin, die als Interaktionsdomänen zu LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin identifiziert wurden. Diese Peptide oder analogen Moleküle können ebenso die Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und LEF-1/TCF hemmen, oder wie im Falle von APC oder Conductin, die Konzentration von  $\beta$ -Catenin in der Zelle erhöhen. Diese letzteren ...

DE 199 09 251 A 1

Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten beeinflussen. Darunter befinden sich von LEF-1/TCF4-Transkriptionsfaktoren und von  $\beta$ -Catenin abgeleitete Peptide und ähnliche Moleküle.

Sie betrifft ferner ein Verfahren zur Auffindung solcher Substanzen sowie die Anwendung des Mittels, bevorzugt für die Therapie von Tumoren wie Kolonkarzinomen und Melanomen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind demzufolge die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

$\beta$ -Catenin ist ein zytoplasmatisches Protein mit verschiedenen Funktionen in der Zelle. Im Komplex mit den Zelladhäsionsmolekülen der Cadherin-Familie stellt  $\beta$ -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett her (Hülsken, J. et al., E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J-Cell-Biol. 127: 2061-9, 1994). Zusätzlich ist  $\beta$ -Catenin eine Komponente der Wnt-Signaltransduktion, die in der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielt. Der Transkriptionsfaktor LEF-1 wurde als Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin in dieser Signalkaskade identifiziert (Behrens, J. et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature, 382: 638-42, 1996). Der Mechanismus der Signaltransduktion durch  $\beta$ -Catenin und LEF-1 ist geklärt: Er besteht in dem durch LEF-1 vermittelten Transport von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Im Zellkern reguliert dieser Komplex die Genexpression durch die im Komplex veränderte, LEF-1 induzierte DNA-Biegung und durch die carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne von  $\beta$ -Catenin. Inzwischen wurde gezeigt, daß auch andere Mitglieder der LEF-1/TCF-Familie von Transkriptionsfaktoren, z. B. TCF-4 diese Signaltransduktion vermitteln können (Korinek, V. et al., Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/colon carcinoma. Science, 275: 1784-87, 1997).

Voraussetzung für diese  $\beta$ -Catenin-abhängige Signaltransduktion ist die Stabilisierung des zytoplasmatischen Pools von freiem, nicht Cadherin-gebundenem  $\beta$ -Catenin. Dieser Pool wird durch die Glykogen-Synthetase-Kinase 3 $\beta$ , durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC sowie durch Conductin/Axin negativ reguliert.

Für Karzinome und Melanome wurde gezeigt, daß Mutationen im N-Terminus von  $\beta$ -Catenin oder in der  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne von APC diese Regulation aufheben (Morin, P.J. et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science, 275: 1787-90, 1997). Als Konsequenz wird der  $\beta$ -Catenin-Pool stabilisiert. In Melanomen führt diese Stabilisierung zur LEF-1 vermittelten Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, während in Kolonkarzinomen vor allem TCF4 diese Funktion erfüllt. Die transkriptionelle Aktivität des Komplexes in Karzinom-Zelllinien wurde durch die Aktivierung eines Reportergens belegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese Aktivität in APC-defizienten Kolonkarzinom-Zelllinien nach Wiedereinführung von APC inhibiert wurde. APC-Mutationen wurden in der überwiegenden Mehrheit von Kolonkarzinomen identifiziert, während nicht APC-defiziente Tumore Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen aufweisen. Das Resultat dieser Mutationen von APC oder  $\beta$ -Catenin ist die Aktivierung der Signaltransduktion durch den  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplex. Es unterstreicht die Schlüsselrolle von  $\beta$ -Catenin in der Tumorentstehung. Da APC-Mutationen als ein frühes Ereignis in der Entstehung von Kolontumoren identifiziert wurden, ist die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplexes wahrscheinlich ein zentraler Schritt in der Tumorentstehung.

Es wurde bereits versucht, die Schlüsselrolle von  $\beta$ -Catenin in der Tumorentstehung für die Entwicklung von Tumortheraeutika auszunutzen. Nahezu zeitgleich wurden in den USA zwei Patentanmeldungen vorgenommen, die inzwischen als WO-Schriften veröffentlicht wurden. In WO 98/41631 (John Hopkins Universität – B. Vogelstein) wird die Beeinflussung von Interaktionen von  $\beta$ -Catenin, TCF-4 und dem Tumorsuppressor-Protein APC mit dem Ziel der Verhinderung von Krebsentstehung beansprucht. Dabei wurde gezeigt, daß Produkte von mutierten APC-Genen, die in Kolorektal-Tumoren nachgewiesen wurden, die  $\beta$ -Catenin/TCF-4-Transkriptionsaktivierung nicht mehr regulieren können. Weiterhin weisen Kolorektal-Tumore mit intakten APC-Genen Aktivierungsmutationen von  $\beta$ -Catenin im N-Terminus auf, was die Funktion der wichtigen Phosphorylierungsorte beeinflusst. Daraus wird abgeleitet, daß die Regulierung von  $\beta$ -Catenin für den Tumorsuppressorwirkung von APC kritisch ist und daß diese Regulierung durch Mutationen in APC oder in  $\beta$ -Catenin umgangen werden kann. Der Hauptanspruch betrifft das intronfreie DNA-Molekül, welches für TCF-4 kodiert.

WO 98/42296 (Onyx Pharmaceuticals Inc. – Rubinfeld) betrifft Zusammensetzungen und Methoden zur Diagnose und zur Behandlung von Krankheiten, die durch  $\beta$ -Catenin/Transkriptionsfaktor-Interaktionen ausgelöst werden. Der Hauptanspruch betrifft das isolierte, stabilisierte  $\beta$ -Catenin und seine Fragmente, solche Fragmente sind allerdings nicht angegeben worden.

Die hier beschriebene Erfindung hat zum einen das Ziel, neue Mittel zur Behandlung von Karzinomen bzw. aberranter Gewebs- und Organentwicklung zur Verfügung zu stellen. Ihr liegt die spezielle Aufgabe zugrunde, die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren als Voraussetzung der Translokation und der Aktivität des Komplexes im Zellkern zu beeinflussen. Diese Modulation soll spezifisch sein, d. h. darf mit anderen Interaktionen von  $\beta$ -Catenin (z. B. mit APC, Conductin oder E-cadherin) nicht interferieren. Ein Ziel der Erfindung besteht außerdem darin, ELISA-Verfahren zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken zur Auffindung von Molekülen (u. a. Peptiden, organischen Verbindungen) zu entwickeln, die hochspezifisch nur jeweils eine Interaktion des  $\beta$ -Catenin beeinflussen.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

In der ersten Realisierung der Erfindung wurden die Bindungsdomänen der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren für  $\beta$ -Catenin identifiziert (Abb. 1). Sie sind Ausgangspunkt für die Gewinnung der erfindungsgemäßen Peptide und ähnlicher Moleküle. Diese Peptide bestehen bevorzugt aus 10–20 Aminosäuren langen Sequenzen aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4 (Abb. 2). Besonders bevorzugt sind es die Peptide

- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 11–34 von LEF-1 (Abb. 1) folgender Sequenz GDPELCATDEMIPFKDEGDPQKEK
- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 14–27 von LEF-1 folgender Sequenz ELCATDEMIPFKDE
- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 7–29 von TCF-4 (Abbildung 2) folgender Sequenz GGDDLGN-

DELISFKDEGEQEEK

– bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 10–23 von TCF-4 folgender Sequenz DLGANDELISFKDE

Bevorzugt sind ferner Peptide, in denen die sauren Aminosäuren im Abstand von 5 Aminosäuren angeordnet und durch hydrophobe und basische Aminosäuren flankiert sind (**Abb. 2**).

Diese Peptide können gemäß der Erfindung für die Tumorthherapie eingesetzt werden, wofür zwei prinzipielle Wege möglich sind.

#### a) Verwendung der Peptide als solche

Ein direkter Einsatz der Peptide für die Behandlung von Tumoren kommt wegen ihrer Instabilität gegenüber Proteasen und wegen des Mangels an Membranpermeabilität im allgemeinen nicht in Betracht. Eine Stabilisierung erfolgt durch Kopplung mit einem zweiten Peptid, wofür das sog. Antennapedia-Peptid RQIEIWFQNRMRMEWEE hervorragend geeignet ist. Dieses Peptid ist in der Lage, bis zu 100 Aminosäuren lange angekoppelte Peptide durch Zellmembranen in das Zytoplasma und den Zellkern zu transportieren. Die gekoppelten Peptide können vorteilhaft in der Tumorthherapie eingesetzt werden.

#### b) Verwendung der Peptide zum Drugdesign (Peptidmimikry)

Die erfindungsgemäßen Peptide dienen auch als Grundlage zum Design von Substanzen, die durch gezielte Modifikation die Stabilität und Wirksamkeit in der Zelle erhöhen ("Peptidomimetics"). Beispielsweise kann das durch Einführen reaktiver Gruppen, Austausch von Aminosäuren oder Einführung nichthydrolysierbarer peptidähnlicher Bindungen erfolgen.

Durch den Austausch des Kohlenstoffgerüsts der Peptide gegen synthetische Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen kann die Stabilität der Moleküle ebenfalls erhöht werden (Non-Peptidomimetics). Dieses molekulare Mimikry der biologischen Aktivität der von der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1/TCF für  $\beta$ -Catenin abgeleiteten inhibitorischen Peptide (**Abb. 3** und **4**) ermöglicht die Produktion potenterer Wirkstoffe für die Tumorthherapie.

In einem zweiten Schritt zur Realisierung der Erfindung wurden die Regionen von  $\beta$ -Catenin identifiziert, die für die spezifischen Bindungen zu LEF-1/TCF4, APC (20 und 15 Aminosäuren-Repeats enthaltende Domänen), Conductin und E-Cadherin verantwortlich sind. Es wurde gefunden, daß diese Regionen zum Teil überlappen und die Armadillo-Domänen 3–8 von  $\beta$ -Catenin betreffen (**Abb. 5** und **6**). Der Kernpunkt dieses Schritts besteht darin, daß Mutationen von  $\beta$ -Catenin erzeugt wurden, welche spezifische Interaktionen zu einzelnen Partnern verhindern. Es handelt sich im einzelnen um folgende Mutationen, bezogen auf die in der Anlage beschriebene Teilsequenz von  $\beta$ -Catenin (Tab. 1):

His 470, Arg 469: Keine Interaktion mit LEF-1/TCF4

Trp 383: Keine Interaktion mit APC 20aa

Arg 386: Keine Interaktion mit APC 15aa

Phe 253, Arg 274, Trp 338: Keine Interaktion mit Conductin

Damit ist die Möglichkeit gegeben, Peptide und analoge Moleküle zu generieren, die spezifisch die Interaktionen von  $\beta$ -Catenin mit APC,  $\beta$ -Catenin mit Conductin oder  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin hemmen. Diese Moleküle eignen sich ebenso zur Generierung neuer Pharmaka. Dazu werden potentielle Kandidaten für eine cancerostatische Wirksamkeit mit  $\beta$ -Catenin und z. B. LEF-1 unter Bedingungen in Kontakt gebracht (z. B. in einem ELISA), bei denen diese Proteine eine Bindung eingehen. Es wird dann gemessen, in welchem Maße diese Bindung durch die zugesetzte Substanz gehemmt wird.

Die Wnt-Signaltransduktion und ihre Komponenten spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung von Geweben und Organen, z. B. von bestimmten Regionen des Gehirns, der Extremitäten, der Niere sowie der Haut. Die gewebsspezifische Ausschaltung des  $\beta$ -Catenin-Gens in der Maus zeigt, daß  $\beta$ -Catenin für die Entwicklung der Haut und insbesondere der Haare von Bedeutung ist. Dadurch erstreckt sich die Erfindung auch auf Verfahren der Förderung der Haut- und Haarentwicklung durch erhöhte Expression von  $\beta$ -Catenin (oder von stabilerem  $\beta$ -Catenin). Das kann man beispielsweise durch Inhibition der Interaktion mit APC oder Conductin erreichen.

So können erfindungsgemäß spezifische Inhibitoren der  $\beta$ -Catenin/APC- oder der  $\beta$ -Catenin/Conductin-Interaktion genutzt werden, um in Zellen und Geweben erhöhte  $\beta$ -Catenin-Konzentrationen zu erreichen. Ebenso fördert Conductin, das ein analoges Protein zu Axin ist, den Abbau von  $\beta$ -Catenin. Inhibitoren der  $\beta$ -Catenin/APC- und  $\beta$ -Catenin/Conductin-Interaktion kann eingesetzt werden, um in Organentwicklungsvorgänge einzugreifen. Z.B. könnte so die Haarentwicklung beim Menschen lokal gefördert werden.

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

#### 1. Charakterisierung des minimalen Bindungsdomäne von LEF/TCF für $\beta$ -Catenin

Zur Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne wurde das "Hefe-2-Hybrid-System" eingesetzt (**Abb. 1**). Die minimale Bindungsdomäne konnte auf die N-terminalen Aminosäuren 11–27 von LEF-1 begrenzt werden, welches den Aminosäuren 7–29 in TCF-4 entspricht (**Abb. 2**). Die Interaktion von N-terminalen LEF-1 Fragmenten mit  $\beta$ -Catenin wurde anhand der Aktivierung eines lacZ-Reportergens bestimmt (s. Ausführungsbeispiel).

Im ELISA mit synthetischen Peptiden wurde gezeigt, daß entsprechende Peptide (11–34, 14–27) die  $\beta$ -Catenin/LEF-1-Komplexbildung spezifisch inhibieren. Analoges gilt für die TCF-4 Peptide 7–29 und 10–23 bezüglich der  $\beta$ -Catenin/TCF-4-Komplexbildung (**Abb. 2**).

Die für die Inhibition essentiellen Aminosäuren wurden durch Synthese mutanter Peptide identifiziert (**Abb. 2**). Für die Funktion der Peptide ist eine symmetrische Anordnung von sauren Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutamin-

säure) im Abstand von 5 Aminosäuren flankiert durch hydrophobe Aminosäuren (Leucin, Isoleucin) und eine basische Aminosäure (Lys) wesentlich. Der Austausch von Phenylalanin oder Lysin durch Alanin hebt die Inhibition durch das Peptid ebenfalls auf. Die Bedeutung der sauren und aromatischen Aminosäurereste wurde im Kontext des gesamten LEF-1 Moleküls durch einen Kern-Translokationstest (Abb. 4) von endogenem  $\beta$ -Catenin und durch einen Transaktivierungstest in Säugerzellen bestätigt.

## 2) Charakterisierung der Interaktionsdomäne von $\beta$ -Catenin für LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin

Die Armadillo-Region von  $\beta$ -Catenin wurde von Huber et al. 1997 kristallisiert und durch Röntgen-Kristall-Strukturanalyse charakterisiert. Eine basische Grube konnte identifiziert werden, die für die Interaktion mit den sauren Aminosäuren von LEF-1 (siehe oben) verantwortlich sein könnte. Es wurden deshalb basische (Lys, Arg, His) sowie einige aromatische (Trp) Aminosäuren in den Armadillo-Wiederholungseinheiten 3–9 von  $\beta$ -Catenin mutiert (Abb. 5). Es wurde darauf geachtet, daß vor allem freie Aminosäurereste der Helices 3, die die Basis der Grube bilden, sowie einige Aminosäurereste des einen Randes (Helix 1) mutiert wurden. Die mutanten  $\beta$ -Catenine wurden darauf getestet, ob sie noch mit den Interaktionspartnern LEF/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin interagieren (Tab. 2). Durch dieses Verfahren konnten kritische Aminosäurereste von  $\beta$ -Catenin identifiziert werden, die für spezifische Interaktionen von Bedeutung sind (Abb. 5 und 6). Es ist dadurch gelungen, spezifische Regionen von  $\beta$ -Catenin für die einzelnen Interaktionspartner zu identifizieren (Abb. 6). Diese Regionen sind für die Identifizierung von Molekülen wichtig, welche spezifisch die Interaktion von  $\beta$ -Catenin für LEF-1, APC, Conductin oder E-cadherin beeinflussen.

Der Befund, daß die Bindungsdomänen von  $\beta$ -Catenin mit LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin partiell überlappen, ist essentiell für die Selektion neuer Therapeutika. Die Selektion wird z. B. folgendermaßen durchgeführt: Es werden Substanzbibliotheken darauf getestet, ob sie spezifisch die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF-1/TCF, von  $\beta$ -Catenin mit APC (20 oder 15 Aminosäure-Repeats), von  $\beta$ -Catenin mit Conductin oder von  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin beeinflussen. Im weiteren werden Peptide oder ähnliche Oberflächenstrukturen der Armadillo-Region 3–8 von  $\beta$ -Catenin generiert, die durch Mutation von  $\beta$ -Catenin identifiziert wurden, und diese werden anschließend auf ihre Wirkung auf die Bindung der verschiedenen Interaktionspartner getestet.

Die Interaktion mit LEF-1/TCF-4 ist onkogener Natur, d. h. fördert potentiell die Krebsentstehung, die Interaktionen mit APC, Conductin und E-Cadherin sind potentiell antionkogen, d. h. sie inhibieren die Krebsentstehung. Jede neue Substanz, die in den Wnt-Signalweg eingreift, muß deshalb sorgfältig auf ihre spezifische Wirkung getestet werden. Die hier vorgestellte Charakterisierung der Bindungsdomäne von  $\beta$ -Catenin stellt dafür die Grundlage dar. Substanzen, die spezifisch die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF-4-Interaktion vermindern, sind deshalb potentielle Anti-Krebs-Therapeutika. Substanzen, die die Interaktion zu APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen, fördern potentiell den Wnt-Signalweg und können zur verstärkten Gewebeentwicklung, z. B. zur Förderung des Haarwuchses eingesetzt werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

### 1. Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 für $\beta$ -Catenin

Die Interaktion von Teildomänen von LEF-1 mit  $\beta$ -Catenin wurde im Hefe-2-Hybrid System durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Angaben des Herstellers (Clontech) analysiert (Abb. 1). Für diesen Zweck wurde die für die N-terminalen Teildomänen von LEF-1 kodierende DNA in die Klonierungsstelle des Lex-A DNA-Bindungsdomäne enthaltenden Vektors BTM116 inseriert und durch Sequenzierung überprüft. Die DNA-Fragmente von LEF-1 wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Inkubation mit Restriktionsendonukleasen hergestellt. Die  $\beta$ -Catenin kodierende DNA wurde in den Vektor pGAD424 (Clontech) für die Aktivierungsdomäne von GALT kloniert (Behrens et al. 1996). Für den Vergleich der Interaktion der Hybride wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten unabhängiger Experimente gemittelt.

Die Spezifität der Interaktion der LEF-1-Hybride mit  $\beta$ -Catenin wurde anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Hefen, die die LEF-Hybride und die GAL-4 Aktivierungsdomäne ohne  $\beta$ -Catenin herstellten, kontrolliert (Abb. 1). Die Expression der LEF-1 Hybride wurde im Immunoblot mit Hefezell-Lysaten durch Antikörper (Clontech) gegen die Lex-A-Domäne der Hybride kontrolliert. Für die Herstellung der Lysate wurden gleiche Hefemengen nach Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen eingesetzt.

### 2. Charakterisierung der $\beta$ -Catenin Bindungsdomäne von LEF-1 im Test auf den Kerntransport

Durch in vitro Mutagenese der cDNA von LEF-1 wurden Punktmutationen in der Bindungsdomäne von LEF-1 für  $\beta$ -Catenin eingeführt. Die Mutagenese erfolgte mit dem "Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit" der Firma Clontech nach Angaben des Herstellers. Folgende Aminosäuren wurden durch Alanin substituiert: Glu 14, Asp 19, Glu 20, Phe 24, Lys 25, Asp 26 und Glu 27. Die Mutanten wurden durch Sequenzierung überprüft und in den Vektor pCG-LEF-1 (Behrens et al. 1996) kloniert. Nach Transfektion von MDCK-Zellen mit LEF-1 oder seinen Mutanten, wurde die Translokation von endogenem  $\beta$ -Catenin in den Zellkern mit immunocytoologischen Methoden analysiert. Hierfür wurden je  $2.5 \times 10^5$  MDCK-Zellen mit pCG-LEF-1 transfiziert. Die Immunodetektion von LEF-1 erfolgte mit Anti LEF-1 Serum aus Kaninchen und Cy2-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörpern, die Detektion von  $\beta$ -Catenin erfolgte mit monoklonalen Antikörpern und Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpern (Abb. 4A).

### 3. Charakterisierung und Quantifizierung inhibitorischer Peptide im ELISA

Für die Quantifizierung der Inhibition der LEF-1/ $\beta$ -Catenin Interaktion durch synthetische Peptide wurden beide Proteine in Bakterien rekombinant mit N-terminalen Histidin-Sequenzen hergestellt und durch Nickel-Chromatographie gereinigt (Behrens et al. 1996). Die Peptide wurden von der Firma Biosyntan mit dem PSSM-8 Automaten (Shimadzu, Ja-

pan) unter Verwendung der Fmoc/But-Strategie hergestellt (E. Atherton und R.C. Sheppard. 1989 IRL Press, Oxford: "Solid phase peptide synthesis – a practical approach"). Ca. 50 ng LEF-1 wurde an den Näpfen von ELISA-Platten für 90 Minuten bei Raumtemperatur adsorbiert. Anschließend wurden die Näpfe mit 5% Magermilch-Pulver in PBS für 16 Stunden bei 40 °C abgedeckt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in PBS mit 50 mM Tris HCl (pH 7.5). Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS wurden die Peptidverdünnungen zugegeben. Die Inkubation mit 50–100 ng  $\beta$ -Catenin wurden für 10 Minuten in Gegenwart von 200 mg/ml BSA durchgeführt. Die Komplexbildung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin wurde durch den Antikörper PA2 gegen den Carboxy-Terminus von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen (Hülsken et al. 1994). PA2 wurde für 1,0. Minuten in einer Titerverdünnung von 1 : 5000 in 3% Magermilchpulver in PBS zugegeben. Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS erfolgte, die Quantifizierung durch Peroxidase konjugierte Nachweisantikörper (1 : 2500 in 3% Magermilchpulver in PBS, Dianova) und den Umsatz von o-Phenylendiamin durch photometrische Messung bei 405 nm bestimmt. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 100  $\mu$ M bis 0.3  $\mu$ M eingesetzt. Zur Kontrolle der Spezifität der Inhibition der Interaktion von LEF-1/ $\beta$ -Catenin wurde  $\beta$ -Catenin in den Näpfen adsorbiert und mit den gleichen Antikörpern in Gegenwart und Abwesenheit der Peptide nachgewiesen (Abb. 2 und 3).

Für die Mutationsanalyse der Peptide wurden bei der Synthese die angegebenen Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Die Quantifizierung der Inhibition der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF-1 erfolgte wie bereits beschrieben (Abb. 2).

#### 4) Herstellung und Testen von Mutanten von $\beta$ -Catenin, die die Interaktion zu LEF-1, APC, Conductin oder E-cadherin modulieren

Die Mutagenese von  $\beta$ -Catenin in den Armadillo-Repeats 3–8 wurde mit dem "Mutagenese Kit" der Firma Clontech nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und die Mutanten durch Sequenzierung überprüft (Abb. 5). In allen Mutanten wurde die ursprüngliche Aminosäure durch Alanin substituiert. Für die Analyse der Interaktionen wurde die für die Aminosäuren Leu218–Leu781 kodierende cDNA von humanen  $\beta$ -Catenin (Armadillo-Repeat 3 bis zum C-terminalen Ende des Proteins) oder seinen Mutanten in den Fusionsvektor für die Aktivierungsdomäne von Gal-4 (pGAD424, Clontech) kloniert. Die cDNA für die Bindungsdomänen der Interaktionspartner wurde in den LexA-Fusionsvektor BTM116 kloniert. Hierfür wurde die cDNA von LEF-1 für die Aminosäuren 1–99, von Conductin für die Aminosäuren Ala342–Arg465, von humanen APC für die Aminosäuren His1012–Glu1215 (APC 15 Aminosäure-Repeats) und für die Aminosäuren Ser1259–Asp1400 (APC 20 Aminosäure-Repeats) und von E-Cadherin für die Aminosäuren Gln773–Asp884 (cytoplasmatische Domäne) mit entsprechenden Primern PCR amplifiziert. Die Interaktion der LexA-Hybride mit  $\beta$ -Catenin und seinen Mutanten wurde anhand der  $\beta$ 3-Galaktosidase Reporteraktivität im Hefe 2-Hybrid System (Protokoll: "Matchmaker", Clontech) quantifiziert (Tab. 2 und Abb. 6).

#### Figuren Legenden

##### Abb. 1

##### Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 für $\beta$ -Catenin

Die Interaktion von Teilen der Bindungsdomäne von LEF-1 mit  $\beta$ -Catenin wurde anhand der  $\beta$ 3-Galaktosidase-Reporteraktivität im Hefe-2-Hybrid System analysiert. Deletion C-terminaler Aminosäuren von LEF-1 bis zum Glu27 und N-terminaler Aminosäuren bis zum Gly10 führt zu keinem Verlust der Bindung (11–27), während weitere Deletionen die Interaktion verhindern (11–23, 17–34). Die minimale Bindungsdomäne von LEF-1 für  $\beta$ -Catenin besteht demnach aus 17 Aminosäuren (11–27) und weist einen sauren Charakter auf. Die Teildomäne von LEF-1 aus Met 21 bis Val 56 zeigt, keine Bindungsaktivität zu  $\beta$ -Catenin.

##### Abb. 2

##### Charakterisierung der minimalen Bindungsdomäne von TCF-4 durch Inhibition der Bindung von $\beta$ -Catenin an LEF-1 im ELISA

Synthetische Peptide aus dem N-Terminus von hTCF-4 mit Substitutionen für die angegebenen Aminosäurereste wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Interaktion von LEF-1 mit  $\beta$ -Catenin zu inhibieren. Substitution der sauren Aminosäurereste von Asp10, Asp15 und Asp22 von TCF-4 durch Alanin führt zur Aufhebung der Inhibition durch die entsprechenden Peptide. Substitution von Phe20 und Lys21 hat die gleiche Wirkung. Durch Deletion wurde eine saure, minimale Bindungsdomäne von TCF-4 für  $\beta$ -Catenin von 14 Aminosäuren Länge (Asp10 bis Glu23) identifiziert.

##### Abb. 3

##### Inhibition der Interaktion von LEF-1 und $\beta$ -Catenin durch synthetische Peptide aus der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 im ELISA

Das synthetische Peptid aus der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 (10–34) hemmt die Interaktion von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin im ELISA. Eine Reduktion der Komplexbildung auf 50% wird bei einer Peptid-Konzentration von 4  $\mu$ M gemessen, während ein Peptid von LEF-1 mit den Aminosäuren Ile35–Val56 die Komplexbildung nicht hemmt.

## Abb. 4

Substitution saurer Aminosäure-Reste und von Phenylalanin in der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 blockiert die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern

A. MDCK-Zellen wurden mit Wildtyp- und Mutanten von LEF-1 transfiziert und die Translokation von endogenem  $\beta$ -Catenin in den Zellkern durch Immunfluoreszenznachweis überprüft. Substitution der sauren Aminosäure-Reste von Asp19, Glu20, Asp26 und Glu27 durch Alanin blockiert die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern; die Substitution der aromatischen Aminosäure Phe24 hat den gleichen Effekt. Die Substitution von Glu14 und Lys25 verhindert die Translokation nicht. Pfeile markieren die LEF-1 transfizierten Zellen in der Immunodetektion für endogenes  $\beta$ -Catenin.

B. Vergleich der minimalen Bindungs-Domänen von LEF-1 und TCF-4 mit den entsprechenden Positionen der Aminosäuren.

## Abb. 5

Mutationen zu Alanin in der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin, die zu einer Reduktion von mehr als 70%- der Interaktion mit LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin führen.

Die Lokalisation der Mutationen in Bezug zum strukturellen Kontext (Helix 1-3, in Rahmen) ist dargestellt. Die Zahlen über den Aminosäuren in der Sequenz kennzeichnen die analysierten Mutanten. Farblich markiert sind die Mutanten mit mehr als 70%-Reduktion in der Interaktion für LEF-1 (rot), APC (blau), Conductin (grün) und E-Cadherin (gelb). Grau unterlegte Aminosäuren stellen in allen Repeats konservierte identische und chemisch ähnliche Aminosäuren dar.

## Abb. 6

Mutationen in der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin, die spezifisch nur die Bindung von LEF-1, APC, Conductin oder E-Cadherin verhindern

Darstellung der Armadillo-Domäne Repeats 3-8 mit Mutationen, die eine Reduktion der jeweiligen Interaktion auf weniger als 30% (rot) oder auf 30-60% (gelb) aufweisen. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Mutanten, die für die jeweilige Interaktion spezifisch sind:

Arg469 und His470 für die Bindung von LEF-1, Trp383 für APC (20 Aminosäure-Repeats), Arg386 für APC (15 Aminosäure-Repeats), Phe253, Arg274 und Trp338 für Conductin. Die Interaktionen wurden im Hefe 2-Hybrid System anhand der  $\beta$ 3-Galaktosidase Reporteraktivität bestimmt.

## Tab. 1

Aminosäuresequenz der Armadillo-Repeats 3-8 von humanen  $\beta$ -Catenin

## Tab. 2

Zusammenstellung aller  $\beta$ -Catenin-Mutanten mit weniger als 60% Bindungsaktivität zu den angegebenen Bindungsdomänen von LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin.

## Tab.1

Aminosäuresequenz des humanen  $\beta$ -Catenin (Armadillo-Repeats 3-8)

arm 3	(224-264)	HREGLLAIFKSGGI.PALVKMLGSPVDSVLFYAITTLHNLLL
arm 4	(265-306)	HQEGA MAVRLAGGLQKMVALLNKNVNFALAITTDCLQILAY
arm 5	(307-349)	GNQESKLIILASGGPQALVNIMRTYTYEKLILWTTSRVLKVLVS
arm 6	(350-390)	CSSNKPAIVEAGGMQALGLHLTDPSQRLVQNCLWTLRNLSD
arm 7	(391-429)	AATKQEGMEGLLGTLVQLLGSDDINNVTCAAGILSNLTC
arm 8	(430-473)	NNYKNKMMVCQVGIEALVRTVLRAGDREDITEPAICALRHILTS

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tabelle 2

Interaktion von  $\beta$ -Catenin-Mutanten mit LEF-1, APC (20 und 15 Aminosäure-Repeats), Conductin und E-Cadherin

	$\beta$ -Catenin Mutanten	arm. Einh.	Interaktion mit				
			LEF-1	APC-20	APC-15	Conductin	E-Cadherin
5							
10							
15	Phe 253	3	-	40	-	17	-
	His 260	3	53	37	-	1	-
20	Arg 274	4	-	40	-	29	50
	Lys 292	4	-	28	-	5	-
	Trp 338	5	-	55	-	20	-
25	Arg 342	5	-	29	-	20	41
	Lys 345	5	38	0	-	22	27
30	Lys 354	6	38	-	54	43	40
	Trp 383	6	-	0	59	-	-
35	Arg 386	6	35		12	45	-
	Lys 394	7	-	-	-	42	-
40	Lys 435	8	-	-	30	42	-
	Arg 457	8	-	-	-	36	-
45	Arg 469	8	17	-	-	-	50
	His 470	8	2	47	60	-	-

Die Werte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Interaktion mit Wildtyp- $\beta$ -Catenin an. Durch - gekennzeichnete Interaktionen entsprechen 60-100% der Wildtyp-Interaktion. Die Werte wurden in Hefe 2-Hybrid-Assays ermittelt.

## Patentansprüche

1. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten beeinflussen.
2. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten hemmen.
3. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten fördern.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF-1 beeinflusst
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit TCF-4 beeinflusst.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit APC 15 bzw. APC 20 Aminosäure-Repeats beeinflusst.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Conductin beeinflusst.
8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin beeinflusst.

9. Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten.
10. Peptid nach Anspruch 9, bestehend aus 10–40 Aminosäuren langen Sequenzen aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4.
11. Peptid nach Anspruch 9–10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 11–34 von LEF-1 folgender Sequenz GDPELCATDEMIPFKDEGDPOKEK
12. Peptid nach Anspruch 9–10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 14–27 von LEF-1 folgender Sequenz ELCATDEMIPFKDE
13. Peptid nach Anspruch 9–10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 7–29 von TCF-4 folgender Sequenz GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK
14. Peptid nach, Anspruch 9–10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 10–23 von TCF-4 folgender Sequenz DLGANDELISFKDE
15. Peptid nach Anspruch 9–14, dadurch gekennzeichnet, daß sie saure Aminosäuren im Abstand von 5 Aminosäuren, die durch hydrophobe Aminosäuren flankiert sind, und eine basische Aminosäure enthalten.
16. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 9–15 zur Tumorthherapie, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide mit einem zweiten Peptid gekoppelt und danach in geeigneter Form appliziert werden.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Peptid das Antennapediapeptid RQIEIWFQNRRMEWEE eingesetzt wird.
18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide und Bindungsregionen zur Erhöhung der Stabilität modifiziert werden (Peptidomimetics).
19. Verwendung der Peptide und Bindungsregionen gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Kohlenstoffgerüst gegen Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen ausgetauscht wird (Non Peptidomimetics).
20. Peptide und ähnliche Moleküle aus der Armadillo-Domäne (arm-Einheiten 3–8) von  $\beta$ -Catenin (Sequenz gemäß Anlage: Tabelle 1) und die Mutanten im Kontext des gesamten  $\beta$ -Catenin-Moleküls, die mindestens eine der spezifischen Interaktionsdomänen zu LEF-1, TCF-4, APC, Conductin oder E-Cadherin umfassen.
21. Peptide und Bindungsregionen von  $\beta$ -Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von His 470 und/oder Arg 469 sowie Fragmente davon umfassen (LEF-1/TCF-Bindungsstelle).
22.  $\beta$ -Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation His 470 und/oder Arg 469.
23. Peptide und Bindungsregionen von  $\beta$ -Catenin, die den Bereich von Trp 383 sowie Fragmente davon umfassen (APC-Bindungsstelle, 20 Aminosäure-Repeat).
24.  $\beta$ -Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation Trp 383.
25. Peptide und Bindungsregionen von  $\beta$ -Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von Arg 386 sowie Fragmente davon umfassen (APC-Bindungsstelle, 15 Aminosäure-Repeat).
26.  $\beta$ -Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation Arg 386.
27. Peptide und Bindungsregionen von  $\beta$ -Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von Arg 386, Phe 253, Arg 274, Trp 338 sowie Fragmente davon umfassen (Conductin-Bindungsstelle).
28.  $\beta$ -Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit einer oder Kombinationen von folgenden Mutationen: Arg 386, Phe 253, Arg 274, Trp 338.
29. Verwendung von Substanzen, die durch Peptidomimetics oder Non-Peptidomimetics aus den Ansprüchen 20–28 gewonnen werden.
30. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20–28 zum Aufbau von Mitteln zur Behandlung von Tumoren, Gewebe und Organschäden, z. B. von Haarausfall.
31. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20–28 zum Screening von Substanzen, die hochspezifisch eine der Interaktionen von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen oder verstärken.
32. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20–28, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen, zur Tumorthherapie.
34. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20–28, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin fördern, zur Gewebe- und Organ-Regeneration (z. B. Haarwuchsförderung).
35. ELISA zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken, auf Komponenten hin, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin beeinflussen.
36. ELISA nach Anspruch 35, enthaltend Peptide und Mutanten sowie ähnliche Moleküle nach den Ansprüchen 9–15, 20–28 zur Identifizierung von Substanzen zur Tumorthherapie, Gewebe- und Organregeneration.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

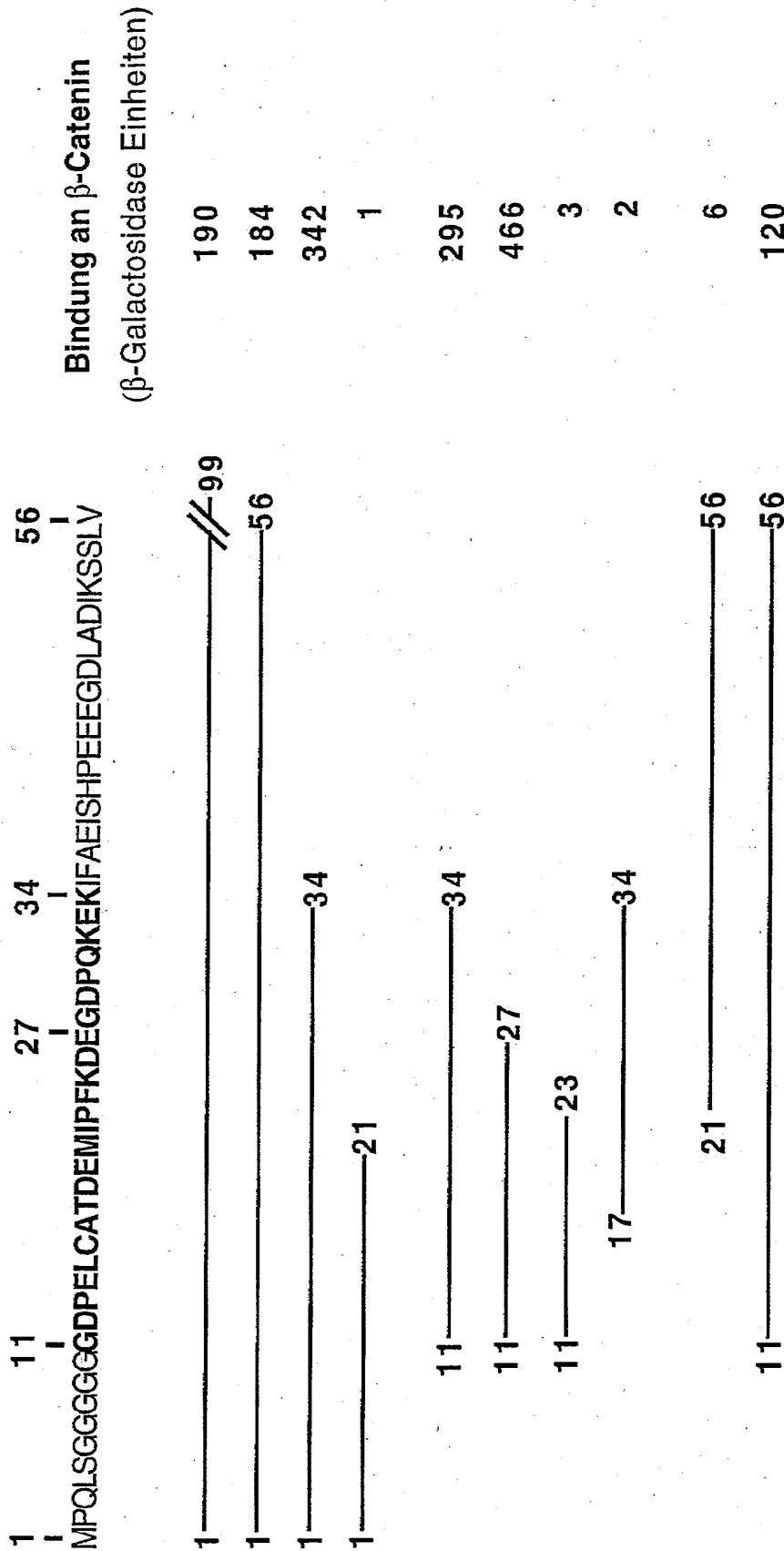
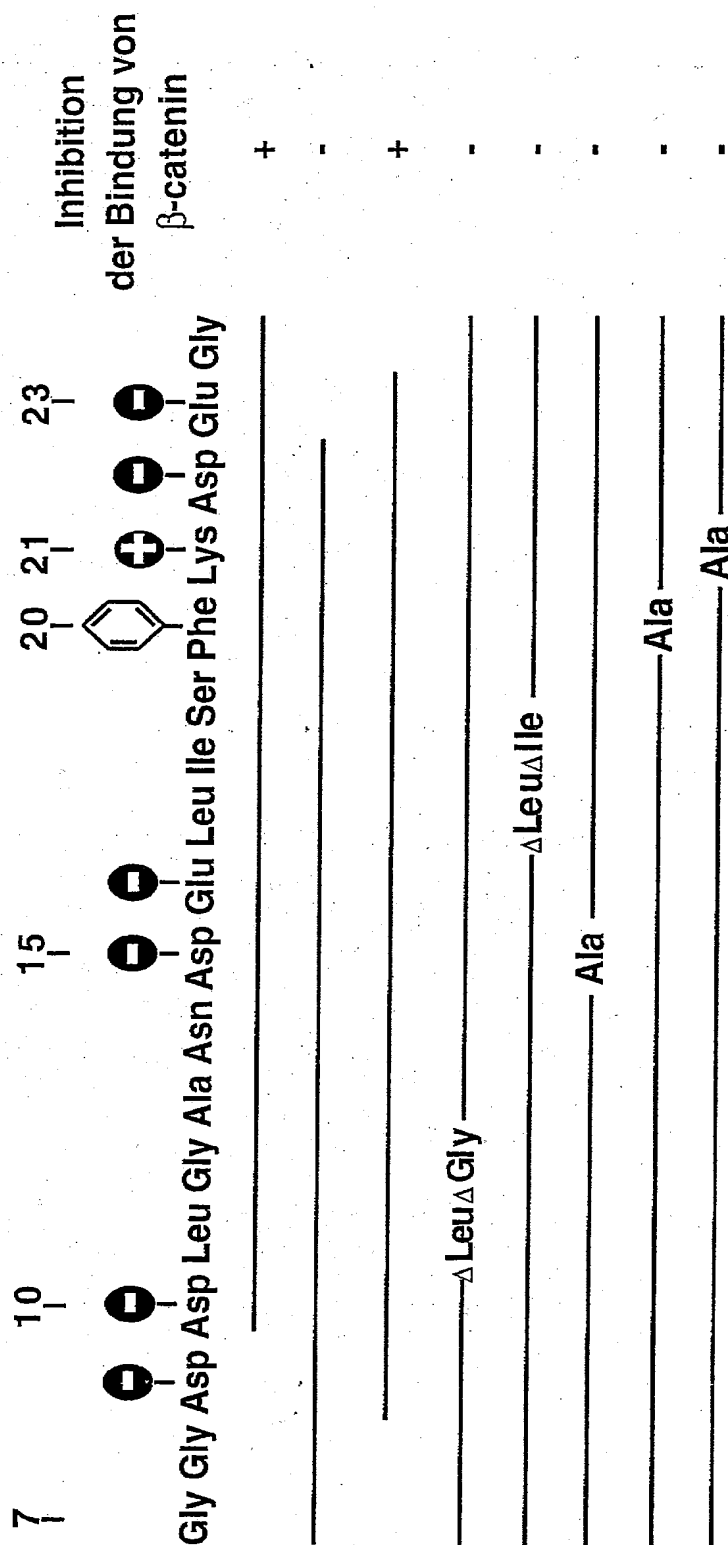
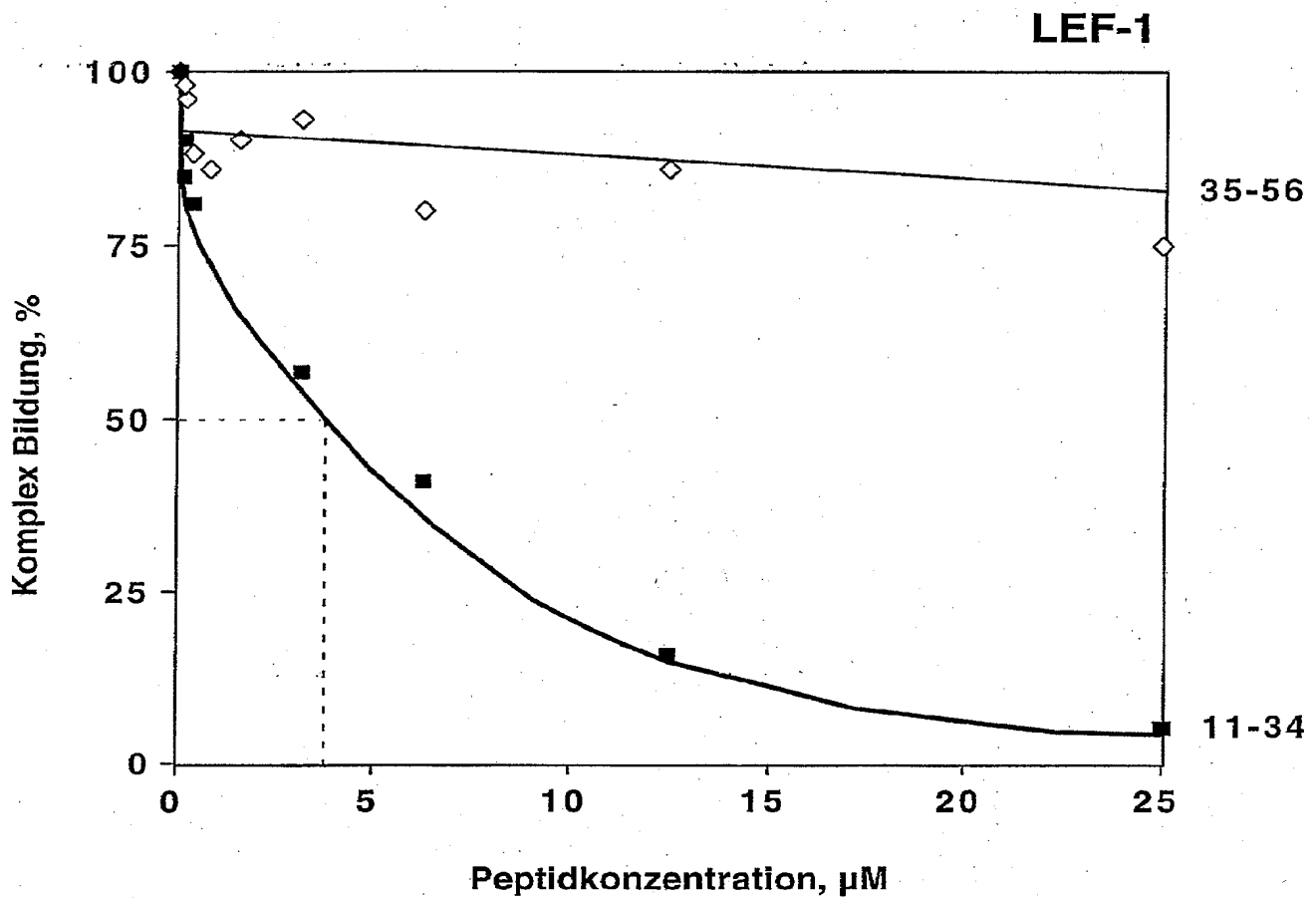


Abb.1

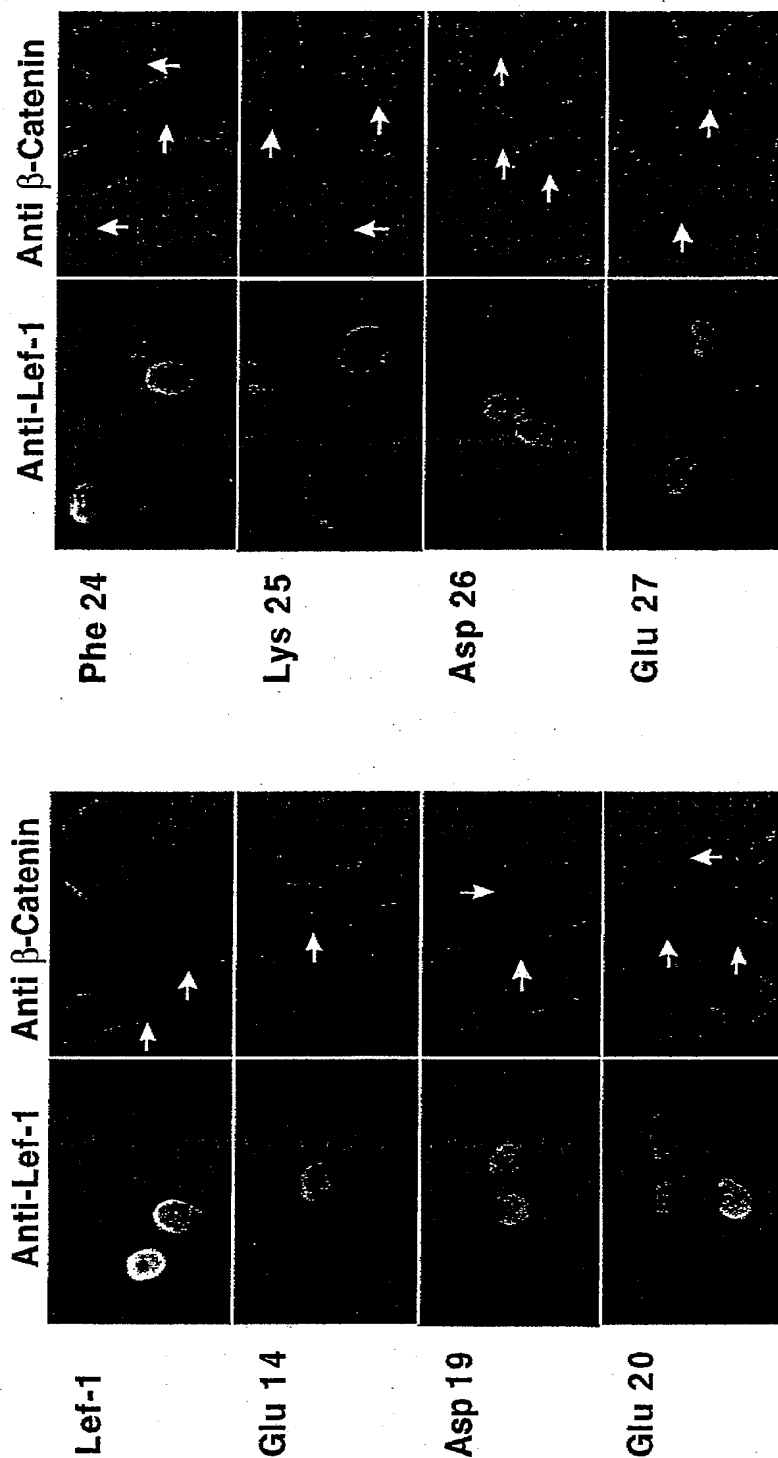
## Abb. 2



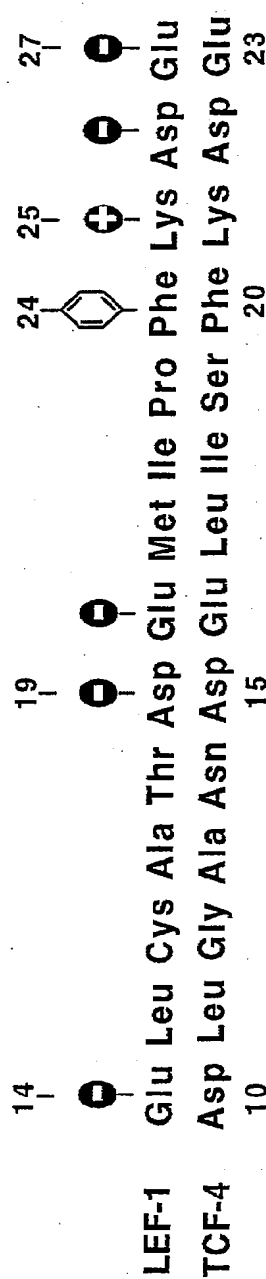
## Inhibition der LEF-1/ $\beta$ -catenin Interaktion durch synthetische Peptide aus der Minimalen Bindungs-Domäne

**Abb. 3**

**A**



**B**



**Abb. 4**

# β-Catenin Mutationen mit < 30 % Transaktivierung

	Helix 1	Helix 2	Helix 3
arm 1 (141-180)	-N---YQDDAE--LATR--AIPELTKLLN--	DE---	DQVVVNKAAMVHQLSK
arm 2 (181-223)	-K---EASRHA--IMRSPQMVSAIVRTMQN--	TN---	DVETARCTAGTLHNLSH
arm 3 (224-264)	-H---REGLLA--IFKS--GGIPALVKML--G--	SP---	VDSVITFYAITTLINLLI
arm 4 (265-306)	HQ---EGAKMA--VRLA--GGLQKMAVLL--N--	KT---	NVFLAITTDCLOILAY
arm 5 (307-349)	GN---QESKLI--ILAS--GGPQALVNMRT--	YT---	YEKLINTTSRVLEKVLISV
arm 6 (350-390)	-C---SSNKPA--IVEA--GGMQALGIHLT--	DP---	SORLVQNCIWTIRNLS
arm 7 (391-429)	AA---TK-QEGM--EGLLGTLVQLIG--	SD---	DINVVTCAAGILSNLTC
arm 8 (430-473)	NN---YKNMM--VCQV--GGIEALVRTVLRA--	GD---	REDITEPAICARHLLTS
arm 9 (474-519)	RHQEAEMAQNA--VRLH--YGLPVVVKKLLH--	PPS---	HWPLI ATVGLIRNLAL
arm 10 (520-582)	-C---PANHAP--LREQ--GAIPRLVQLLVRAHQDTQR--	GVRMEEIVEGCTGALHILAR	
arm 11 (583-623)	-D---VHNRIV--IRGL--NTIPLFVQLLY--	SP---	IENIQRVAAGVLCELAQ
arm 12 (624-664)	-D---KEAAEA--IEAE--GATAPLTLLH--	SR---	NEG VATYAAAVLF RMSE

LEF-1  
 APC  
 Conductin  
 E-Cadherin

Abb. 5

Interaktion von  $\beta$ -Catenin Mutanten mit :

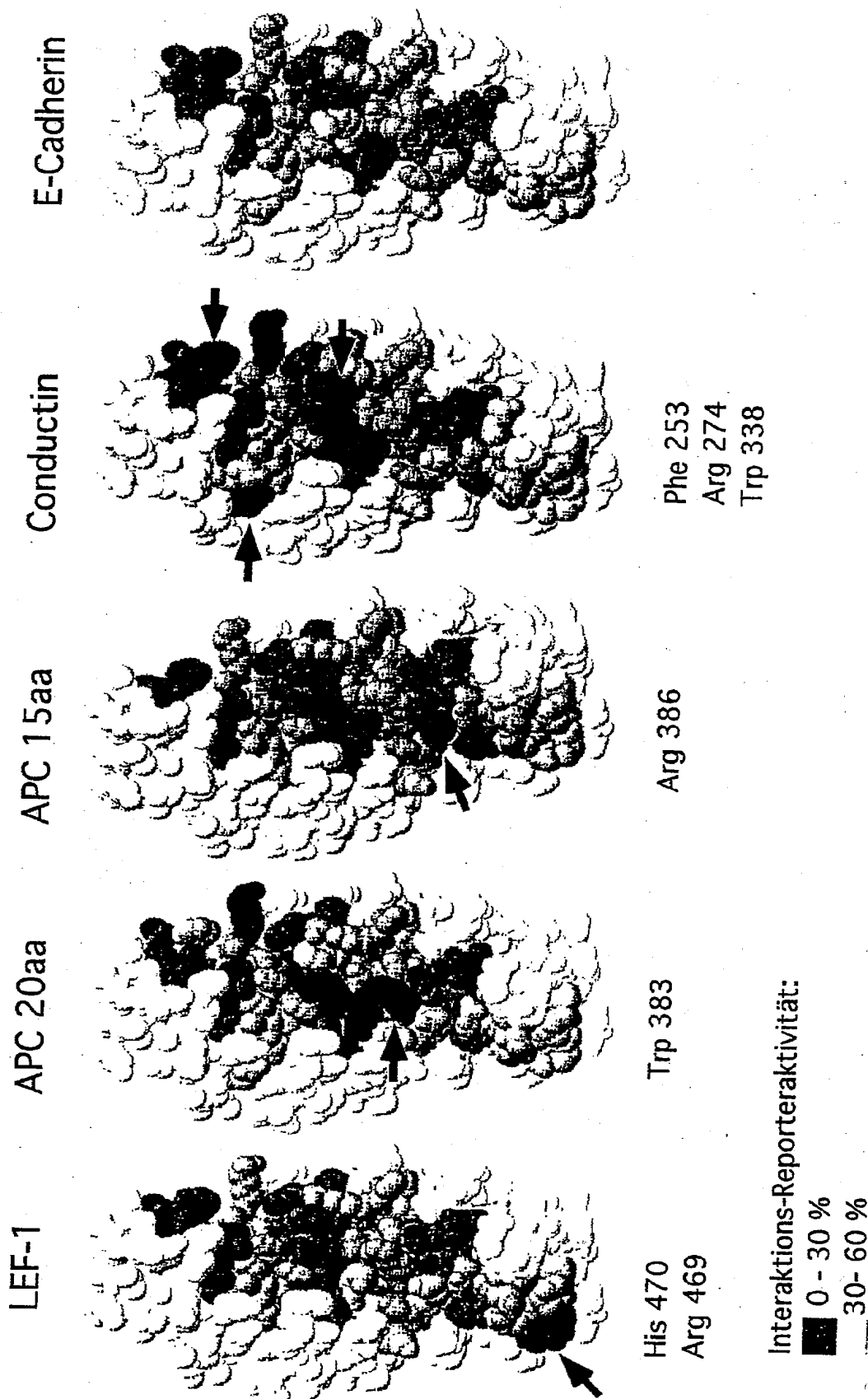


Abb. 6